

## ROLA ŚCIEŻEK SYGNALIZACJI BMP W PROCESACH OSTEOGENEZY

### ROLE OF BMP SIGNALING PATWAYS IN OSTEOGENESIS

Marta DUBIEL, Jagoda LASOTA, Grzegorz TYLKO, Anna M. OSYCZKA

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii,  
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

*Streszczenie:* Białka morfogenetyczne kości (BMP) należą do nadrodziny transformujących czynników wzrostu typu beta i regulują szereg procesów tak podczas rozwoju zarodkowego jak i pourodzeniowego. Po raz pierwszy wykryto je w tkance kostnej i wykazano ich własności promowania kościotworzenia, również w miejscach heterotopowych. Obecnie znanych jest ponad 20 członków rodziny białek BMP; wśród nich najlepsze właściwości osteoinduktywne posiadają BMP2/6/9 i w mniejszym stopniu BMP4/7/8, a BMP2 i BMP7 zostały dopuszczone do użytku klinicznego. Sygnał BMP przekazywany jest poprzez receptory błonowe do jądra komórkowego, a konformacja receptorów w momencie wiązania z ligandem warunkuje wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazywania sygnału. Mogą one przebiegać szlakami kanonicznymi, w których pośredniczą białka Smad, lub szlakami niekanonicznymi, niezależnymi od Smad. Białka Smad fosforylowane przez receptor w domenie C-końcowej przenoszone są do jądra komórkowego i uczestniczą w transkrypcji genów. Smad-zależna ścieżka sygnałowa prowadzi m.in. do ekspresji czynników transkrypcyjnych kluczowych dla kościotworzenia, a z drugiej promuje syntezę antagonistów szlaku sygnalizacyjnego BMP. Ponadto, Smad mogą być fosforylowane w domenie łącznikowej przez kinazy MAP, GSK3 oraz cyklino-zależne kinazy, co może kierować je do proteosomalnej degradacji. Niekanoniczne ścieżki sygnałowe powiązane są z grupą białek GTP-zależnych, szlakiem PI3K/AKT oraz kinazami MAP. Artykuł podsumowuje najnowsze doniesienia dotyczące sygnalizacji BMP, a zwłaszcza białek Smad zaangażowanych w kanoniczną transdukcję sygnału BMP. Szczególną uwagę poświęcono fosforylacji łącznika białek Smad i wpływu tej fosforylacji na procesy kościotworzenia. Pousumowano ponadto obecny stan wiedzy dotyczący kanonicznych oraz niekanonicznych ścieżek sygnalizacji BMP, jak również regulacji osteogennych czynników transkrypcyjnych w wyniku sygnalizacji BMP. Rosnące zapotrzebowanie na terapię tkanki kostnej sprawia, że potencjał kościotwórczy BMP cieszy się ogromnym zainteresowaniem badaczy i jest przedmiotem intensywnych badań mających na celu wykorzystanie BMP w klinice, weterynarii i inżynierii tkanki kostnej.

*Słowa kluczowe:* białka morfogenetyczne kości, białka Smad, sygnalizacja wewnątrzkomórkowa, fosforylacja linkera Smad, osteogeneza

**Summary:** Bone morphogenetic proteins (BMP) belong to the transforming growth factor beta superfamily. They regulate several developmental processes during embryogenesis and in postnatal life. BMP have been discovered for the first time in bone and their osteogenic properties, including heterotopic sites, have been defined. There are presently more than 20 members of BMP family; among them the best osteoinductive properties display BMP2/6/9, slightly less osteoinductive are BMP4/7/8, and BMP2 and BMP7 are clinically available. BMP signal is transduced through membrane receptors to a cell nucleus; upon ligand binding, the receptors' conformation determines intracellular signaling pathways. Canonical pathways engage Smad proteins, whereas non-canonical pathways are Smad-independent. Receptor-phosphorylated Smads at C-terminal domain are shuttled to the nucleus, where participate in gene transcription. Smad-dependent signaling leads e.g. to the expression of key osteogenic transcription factors, on the other hand it promotes the synthesis of BMP signaling pathways' antagonists. Besides, Smads can be phosphorylated by MAPK, GSK3 and cycline dependent kinases in a linker domain, which can lead to their proteosomal degradation. Non-canonical pathways are linked to a group of GTP-depended proteins, PI3K/Akt pathway and MAP kinases. The article summarizes the newest findings regarding the BMP signaling, focusing on Smad proteins engaged in canonical BMP signal transduction. Special attention is paid to Smad linker phosphorylation and its effects on osteogenesis. We have also summarized the present knowledge regarding the canonical and non-canonical BMP pathways and BMP regulation of osteogenic transcription factors. Growing needs for bone tissue therapies prompt researchers to explore BMP osteogenic potential. Extensive research on BMP aims to apply them eventually in clinics, veterinary and bone tissue engineering.

**Key words:** bone morphogenetic proteins, Smad proteins, intracellular signaling, Smad linker phosphorylation, osteogenesis

## WSTĘP

Białka morfogenetyczne kości (ang. *Bone Morphogenetic Proteins*, BMP) po raz pierwszy opisał w 1965 roku Marshall Urist, który zaobserwował, że zde-mineralizowana kwasem hydrochlorowym macierz kości, po przeszczepieniu do mięśnia szkieletowego, indukuje tworzenie tkanki chrzęstnej oraz kostnej [74]. Izolacja pierwszego BMP (tj. BMP3) z ekstraktu kości bydłowej miała jednak miejsce dopiero w 1980 roku. W 1988 roku, Wozney i wsp. sklonowali BMP2 i BMP4 [79], a w 1990 roku opracowano struktury krystaliczne ludzkich białek BMP2 i BMP7 [10]. Oprócz tkanki kostnej, ekspresja BMP zachodzi m.in. w nerkach (BMP3/4/7), płucach (BMP3/4/5/6), jelicie cienkim (BMP2/7), sercu (BMP2/4/6/7), zawiązkach kończyn (BMP2/4/5/7) oraz zębach (BMP3/4/7) [59].

BMP są najlepiej jak dotąd poznanymi cząsteczkami o charakterze osteoinduktywnym, zdolnymi do rekrutacji progenitorów kostnych, ich różnicowania w dojrzale i funkcjonalne komórki kostne, a także indukowania procesów kościotworzenia w miejscach heterotopowych. Spośród liczącej ponad 20 członków rodziny BMP, najbardziej osteoinduktywne są BMP2/6/9 i w mniejszym stopniu BMP4/7/8 [41]. Należące do rodziny BMP białka GDF5/6/7 indukują powstawanie tkanki chrzęstnej i ścięgien [47]. BMP3 i BMP13 negatywnie regulują osteogenezę indukowaną

przez inne BMP. Dla przykładu, BMP3 obniża ekspresję wskaźników osteogenezy takich jak *Runx2* (ang. *Runt-related transcription factor*), osteokalcyna (*Osc*) czy kolagen typu I (*Kol I*) indukowane przez BMP2/4/6/7. Ponadto, jednoczesne podanie BMP2 i BMP3 mysim komórkom mioblastycznym C2C12 hamuje wewnątrzkomórkową ścieżkę sygnalizacji BMP [47]. Najnowsze doniesienia sugerują, że BMP odgrywają również ważną rolę w regulacji czynności narządów o działaniu endokrynnym, a zwłaszcza jajników, przysadki mózgowej oraz nadnerczy [59].

Spośród wszystkich członków rodziny BMP, tylko dwa zostały dopuszczone przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) do prób klinicznych: w 2001 roku rhBMP-7 (Eptotermín- $\alpha$ ), a rok później rhBMP2 (Dibotermín- $\alpha$ ), o nazwach handlowych InductOS®, InFUSE®, i OP1 Implant® [10, 13]. Nadal jednak istnieją spore ograniczenia ich stosowania w leczeniu chorób wymagających aktywacji osteogenezy, bowiem próby kliniczne nie przyniosły tak dobrych rezultatów jak spodziewano się na podstawie wyników dotyczących zwierząt doświadczalnych [6, 13]. Badania naszej grupy wskazują m.in., że mechanizmy przekazywania sygnału BMP w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzenia szpikowego różnią się od tych opisanych dla komórek myszy i szczurów [56]; zależą też od lokalnego środowiska, w których te komórki rezydują [57]. Ponadto, efekty działania BMP *in vitro* są obserwowane przy bardzo małych stężeniach (5-20 ng/ml), natomiast w próbach klinicznych, handlowo dostępne rhBMP2 używa się w stężeniach nawet do 40 mg/ml [64]. Dużym wyzwaniem jest więc dogłębne poznanie mechanizmów działania BMP i polepszenie efektywności działania tych białek bez zwiększania ich dawkowania. Tutaj, zastosowanie mogą znaleźć odpowiednie nośniki BMP takie jak: rusztowania funkcjonalizowane BMP, degradowalne kapsułki uwalniające BMP i/lub stosowanie BMP w kombinacji z innymi czynnikami wzrostowymi, co może zmniejszyć zapotrzebowanie na ich wyższe stężenia [10].

## RODZINA BIAŁEK BMP

W organizmie, wszystkie białka BMP syntetyzowane są jako duże białka prekursorowe zawierające peptyd sygnałowy na N-końcu, prodomenę oraz peptyd dojrzały na C-końcu. Dzięki peptydowi sygnałowemu, białko kierowane jest na swój szlak wydzielniczy, prodomena zapewnia przyjęcie przez niego funkcjonalnej konformacji, natomiast C-końcowy peptyd jest poddawany cięciu proteolitycznemu przez serynową endoproteazę furyny w regionie Arg-X-X-Arg, gdzie X to dowolna reszta aminokwasowa. W konsekwencji powstaje dojrzały i aktywny homo- lub heterodimer o masie cząsteczkowej 20-30 kDa. BMP zawierają siedem konserwatywnych reszt cysteinowych, z których sześć tworzy trzy wiązania dwusiarczkowe w obrębie cząsteczki, nazywane motywem węzła cysteiny, a siódma jest zaangażowana w tworzenie międzycząsteczkowego mostka cysteinowego. Odpowiada on za stabilizację

dimerów BMP [74]. BMP są naturalnie glikozylowane, ale ich glikozylacja nie jest konieczna do właściwego funkcjonowania.

Ponad 20 białek z rodziny BMP zakwalifikowano do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu TGF- $\beta$ . Rodzina BMP podzielona jest na cztery podgrupy, tj BMP2/4, BMP3/3B (GDF10), BMP5/6/7/8a/8b oraz GDF5/6/7 (tab. 1). Wykazują one plejotropowe działanie: regulują najwcześniejsze stadia rozwoju zarodkowego oraz organogenezy, a także biorą udział w gojeniu ran oraz odpowiedzi immunologicznej dorosłych organizmów [29]. Do poznania funkcji nadrodziny białek TGF- $\beta$  oraz ich szlaku sygnalizacyjnego u kręgowców przyczyniły się badania na homologicznych białkach bezkręgowców [60, 78]. Białko Decapentaplegic (Dpp) u *Drosophila melanogaster* jest strukturalnie podobne do BMP2/4 występujących u ssaków. Odpowiada ono za rozwój embrionalny, ale podobnie jak BMP, Dpp stymuluje też tworzenie kości u ssaków w tkankach ektopowych [66].

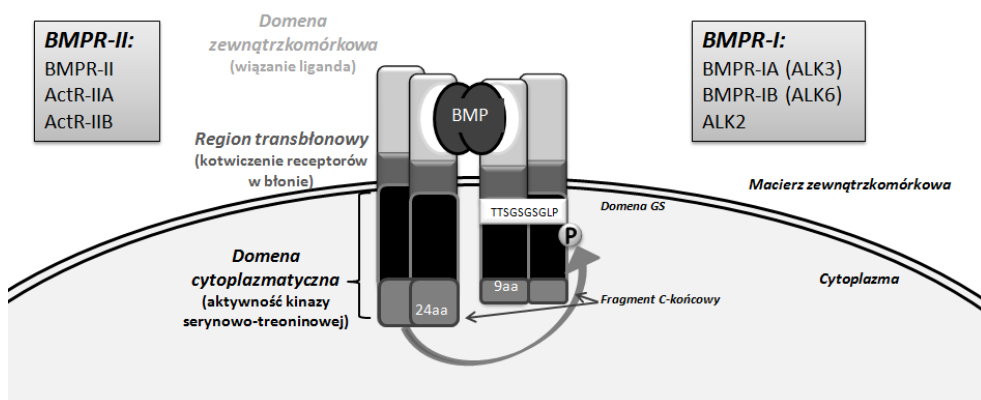
**TABELA 1.** Rodzina białek BMP i ich udział w procesach różnicowania komórek i formowania tkanek

**TABLE 1.** The BMP family and its contribution to cell differentiation and tissue formation

PODGRUPA	OZNACZENIE	FUNKCJA
<b>BMP2/4</b>	<i>BMP2</i>	kościotworzenie
	<i>BMP4</i>	kościotworzenie, rozwój oczu i płuc
<b>BMP3/3B (GDF10)</b>	<i>BMP3</i> <i>BMP3B</i>	hamowanie kościotworzenia
<b>BMP5/6/7/8A/8B</b>	<i>BMP5</i>	formowanie chrząstki
	<i>BMP6</i>	kościotworzenie, formowanie chrząstki
	<i>BMP7</i>	kościotworzenie, rozwój oczu i nerek;
	<i>BMP8</i>	kościotworzenie
	<i>BMP9</i>	rozwój układu nerwowego
	<i>BMP10</i>	rozwój układu krwionośnego
	<i>BMP11</i>	rozwój układu nerwowego
<b>GDF5/6/7</b>	<i>BMP12</i>	powstawanie ścięgien
	<i>BMP13</i>	powstawanie ścięgien i więzadeł
	<i>BMP14</i>	regeneracja ścięgien, kościotworzenie
	<i>BMP15</i>	hamowanie ekspresji receptora hormonu folikulotropiny (w komórkach ziarnistych jajnika)
<b>Inne, nienależące do nadrodziny TGF-<math>\beta</math></b>	<i>BMP1</i>	regulacja biosyntezy i dojrzewania kolagenu

## RECEPTORY BMP

BMP przekazują sygnał do wnętrza komórki za pośrednictwem dwóch typów receptorów błonowych BMPR-I i BMPR-II, należących do kinaz serynowo-treoninowych. Ogólna struktura BMPR-I i -II jest podobna. Zbudowane są one z zewnątrzkomórkowej domeny zawierającej kilka konserwatywnych reszt cysteinowych istotnych dla tworzenia charakterystycznej, trójwymiarowej struktury, biorącej udział w wiązaniu liganda. Region transbłonowy kotwiczony w błonie komórkowej, podczas gdy domena wewnątrzkomórkowa posiada aktywność kinazy serynowo-treoninowej. BMPR-I wyróżnia obecność domeny GS (bogatej w reszty glicyny i seryny) w domenie cytoplazmatycznej oraz bardzo krótki fragment C-końcowy zbudowany co najwyżej z 9 reszt aminokwasowych. Ta sama C-końcowa część wewnątrzkomórkowej domeny BMPR-II zbudowana jest z ponad 24 reszt aminokwasowych (ryc. 1). Do BMPR-I specyficznie wiążących BMP należą: BMPR-1A (ALK-3), BMPR-1B (ALK-6) oraz kinazowy receptor aktywin 2 (ALK-2) – wiążący aktywinę i prawdopodobnie również BMP7. Do BMPR-II należą BMPR-2, receptor aktywin typu II (ACTR2) i receptor aktywin typu IIB (ACTR2B) [44].



RYCINA 1. Struktura receptorów BMP i ich funkcjonalne elementy

FIGURE 1. The structure of BMP receptors and their functional components

## ŚCIEŻKI TRANDUKCJI SYGNAŁU BMP

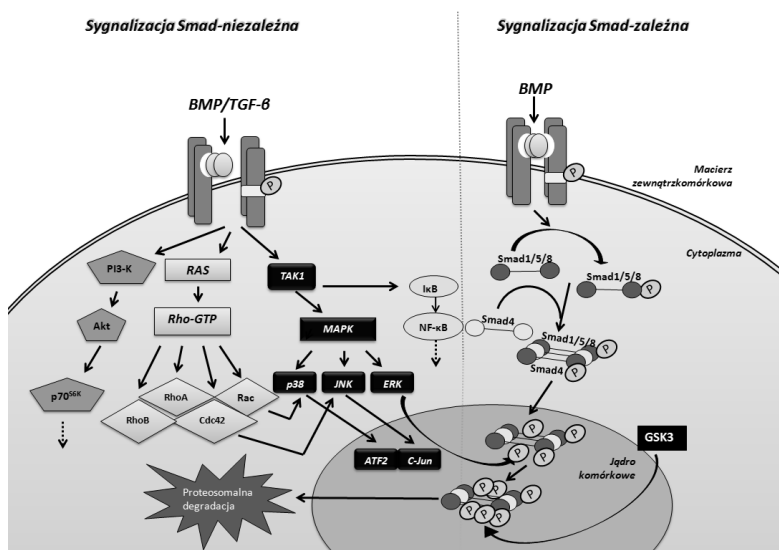
### ŚCIEŻKI KANONICZNE

Przekazywanie sygnału BMP w komórce rozpoczyna się od aktywacji receptorów błonowych przez ligand. Mechanizmy aktywacji receptorów przez ligandy z rodziny TGF- $\beta$  są podobne do mechanizmów aktywacji receptorów

BMP i receptorów aktywin [45]. Receptory TGF- $\beta$ 2 mogą tworzyć homo-oligomery niezależnie od obecności ligandu. Sądzi się, że takie kompleksy są prekursorami dla heterotetramerycznych kompleksów powstających z udziałem BMPR-I i BMPR-II po związaniu liganda. Kompleksy te są konieczne do przekazywania sygnału do wnętrza komórki [12].

W skład heterotetrameru wchodzi dimer BMPR-I oraz dimer BMPR-II. Powstanie kompleksu jest jednak możliwe dzięki dimerycznej naturze liganda. Jeden jego monomer wiąże się z jednym typem receptora, a drugi monomer z drugim typem receptora. W zależności od sposobu wiązania się BMP do receptorów mogą być uruchamiane kanoniczne bądź niekanoniczne ścieżki sygnalizacji BMP, opisane w dalszej części pracy (ryc. 2). Ogólnie, w sytuacji kiedy BMP wiąże się do wcześniej uformowanego heterotetrameru, aktywowana jest kanoniczna ścieżka sygnalizacji BMP. Natomiast, jeśli dopiero po przyłączeniu BMP następuje tworzenie heterotetrameru, uruchamiana jest ścieżka niekanoniczna [54].

Nadekspresja lub brak ekspresji któregoś z receptorów prowadzi do bardzo ciężkich schorzeń układu kostnego. Dla przykładu, w rzadkiej, ale poważnej chorobie genetycznej postępującego kostniejącego zapalenia mięśni (ang. *Fibrodysplasia Ossificans Progressiva*, FOP) przyczyną choroby jest mutacja genu *ACVR1* kodującego receptor BMP typu I (ALK-2). Mutacja powoduje stałą aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych BMP nawet bez obecności liganda [62].



**RYCINA 2.** Ścieżki sygnalizacyjne BMP – niekanoniczna (po lewej), niezależna od białek Smad oraz kanoniczna, z udziałem białek Smad (po prawej)

**FIGURE 2.** BMP signalling pathways – non-canonical pathway independent from Smad proteins (left) and Smad-dependent canonical one (right)

Skutkuje to zastępowaniem mięśni szkieletowych tkanką kostną. Z kolei brak receptora BMPR-1A u myszy prowadzi do ich śmierci jeszcze przed rozwojem kości [28].

W wyniku połączenia BMP z heterotetramerem następuje aktywacja BMPR-I poprzez jego fosforylację przez receptor BMPR-II. BMPR-I fosforylowany jest w domenie GS, na resztach Ser i Tre w obrębie sekwencji TTSGSGSGLP [71]. Aktywacja BMPR-I prowadzi do aktywacji białek Smad będących jego bezpośrednim substratem. Fosforylowane są w tym przypadku wszystkie reszty serynowe sekwencji Ser-Ser-X-Ser (motyw SSXS) na C-końcowym motywie identycznym dla Smad1/2/3/5/8 [30]. Smad4/6/7 nie posiadają tego motywu [84]. Ścieżki sygnalizacyjne zależne od białek Smad nazywane są kanonicznymi, natomiast alternatywne, niekanoniczne ścieżki sygnalizacyjne BMP nie angażują białek Smad [29].

### ŚCIEŻKI NIEKANONICZNE

Niekanoniczne ścieżki sygnalizacji BMP są wciąż słabo poznane. Do Smad-niezależnych ścieżek sygnalizacyjnych BMP należy szlak kinaz MAP (ang. *Mitogen Activated Protein*). Uważa się, że mechanizm aktywacji MAPK przez BMP zachodzi najprawdopodobniej przez kinazę TAK1 (ang. *Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1*), należącą do rodziny MAPKKK [22]. Vinals i wsp. [75] wykazali, że w mysiej linii komórkowej C2C12, BMP mogą aktywować kinazy ERK $\frac{1}{2}$  (ang. *Extracellular-signal-Regulated Kinase*) i p38. Potwierdzili to Huang i wsp. [25], ponieważ te dwie kinazy były konieczne do ekspresji i aktywacji czynnika transkrypcyjnego RUNX2 pod wpływem BMP. RUNX2 wpływa natomiast na ekspresję *Osc*, *Kol I* oraz osteopontyny (*Osp*) – genów istotnych dla postępu procesów osteogenezy [25]. Ponadto, BMP mogą również aktywować ścieżkę NF- $\kappa$ B, ponieważ TAK1 odpowiedzialna jest za fosforylację i aktywację kinazy I $\kappa$ B, która stymuluje sygnalizację NF- $\kappa$ B.

Inne niekanoniczne ścieżki sygnalizacyjne i mechanizmy ich regulacji zostały opisane dla TGF- $\beta$ , stąd możemy przewidywać szlaki niekanoniczne aktywowane przez BMP. Przyjmuje się m.in., że kinaza JNK może być aktywowana zarówno przez TAK1 jak i przez MEKK1, a pośredniczy w tym MKK4, natomiast w przypadku p38 pośredniczy w tym procesie MKK3 lub MKK6. Ponadto, aktywowane przez TGF- $\beta$  kinazy ERK i JNK mogą fosforylować i regulować aktywność białek Smad [38]. Wreszcie, poprzez aktywację JNK i p38, TGF- $\beta$  może aktywować odpowiednio czynniki transkrypcyjne c-Jun oraz ATF-2, istotne dla szlaków sygnalizacyjnych Smad2/3 oraz MAPK. Białka Smad wiążą się w domenie MH1 do regionu zamka leucynowego ATF-2, co zwiększa aktywację ATF-2. Również kinaza p38 indukowana przez TGF- $\beta$  zwiększa aktywację ATF-2 poprzez fosforylację reszt Thr69, Thr71 i Ser90 w ATF-2. Tak więc kanoniczne i niekanoniczne szlaki sygnalizacyjne TGF- $\beta$  mogą aktywować ATF-2 i wzmacniać działanie TGF- $\beta$ . Czynniki



c-Jun także wiąże się z białkami Smad, jednak nie we wszystkich typach komórek obserwowany jest udział tego czynnika w sygnalizacji Smad. [14, 23, 67].

TGF- $\beta$  aktywuje również Rho-podobne białka GTP obejmujące białka RhoA, Rac i Cdc42, a także wzmacnia ekspresję białka RhoB. Ponadto, TGF- $\beta$  reguluje aktywność białek Ras, które zaangażowane są w aktywację Rho-podobnych białek GTP. Białka Rac i Cdc42 regulują aktywację ścieżek JNK i p38 poprzez bezpośrednie oddziaływanie z kinazami MAPKKK [6], natomiast Rho-zależna sygnalizacja JNK wpływa na aktywację Smad [18]. Z kolei aktywacja białek RhoA, Rac i Cdc42 przez TGF- $\beta$  prowadzi do zmian organizacji cytoszkieletu i przekształcenia komórek nabłonkowych w mezenchymalne (tzw. przejście mezenchymalno-epitelialne) [14, 16]. Co ciekawe, aktywację ścieżki sygnalizacji RhoA/ROCK wykazano w stymulowanych BMP2 osteogennych hodowlach ludzkich mezenchymalnych komórek szpikowych (tj. hBMSC, z ang. human Bone Marrow-derived Stem Cells) [5, 77], ale jej zahamowanie pozytywnie wpływało na stymulowaną BMP2 osteogenezę mysiej i szczurzej linii komórek osteoblastycznych *in vivo* i *in vitro* [55, 63, 82].

Do niekanonicznych ścieżek uruchamianych pośrednio przez TGF- $\beta$  należy też szlak 3-fosfoinozytolu/Akt (PI3K/Akt) oraz ścieżka enzymu PP2A (ang. *Protein Phosphatase 2*). W aktywacji PI3K może pośredniczyć białko RhoA lub TGF- $\alpha$  indukowany przez TGF- $\beta$  [14]. Wykazano m.in. współdziałanie ścieżek PI3K/Akt i BMP2 w indukcji osteogenezy w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych [57] oraz w szczurzych komórkach więzadła kręgosłupa [37], a rola ścieżki PI3K/Akt w osteogenezie jest nadal intensywnie badana [1, 20]. Enzym PP2A aktywowany przez TGF- $\beta$  wiąże się z kinazą p70<sup>S6K</sup>, co skutkuje defosforylacją i obniżeniem aktywności p70<sup>S6K</sup>. Kaskada sygnalizacyjna PI3K/p70<sup>S6K</sup> negatywnie reguluje proces kościotworzenia. Zahamowanie tego szlaku wzmacnia proces różnicowania komórek C2C12 w kierunku osteoblastów pod wpływem BMP2 [61, 73].

## BIĄŁKA SMAD

Analiza genomów *Drosophila melanogaster* oraz *Caenorabditis elegans* pozwoliła na identyfikację białek Mad i Sma [11, 12], a niedługo potem ośmiu homologicznych białek występujących u ssaków, nazwanych w skrócie Smad [44]. Białka Smad zostały podzielone na trzy grupy wyróżnione na podstawie różnic strukturalnych i funkcjonalnych:

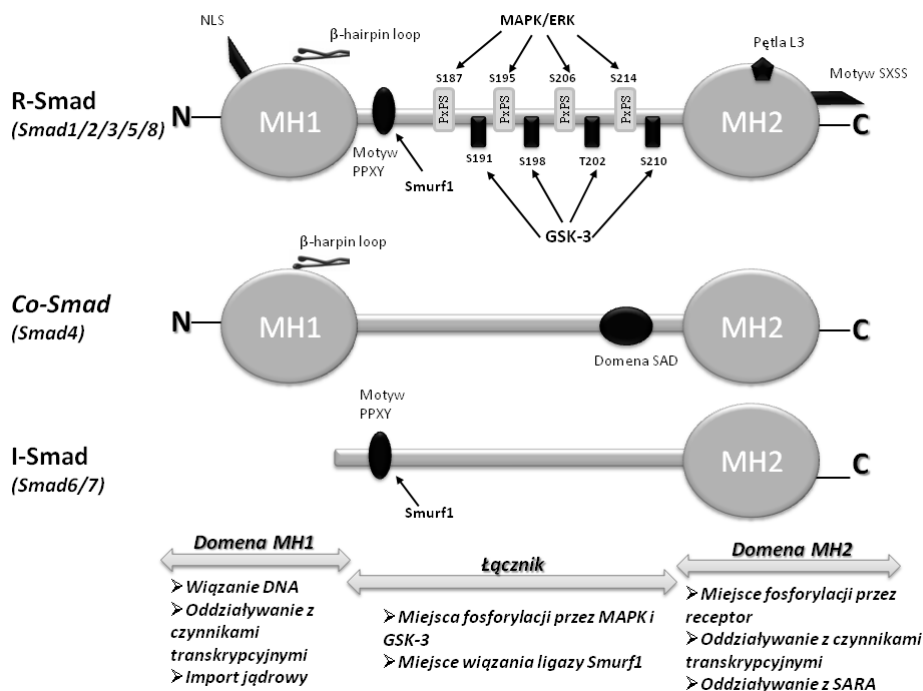
- 1) białka aktywowane przez receptor (R-Smad), do których należą Smad1, 2, 3, 5, 8;
- 2) białko współpośredniczące (co-Smad) Smad4;
- 3) białka hamujące (I-Smad), do których zaliczamy Smad6 i Smad7.

Smad1/5/8 są aktywowane w sygnalizacji BMP i strukturalnie podobne są do białka aktywowanego przez Dpp u *D. melanogaster*. Natomiast Smad2 i Smad3



aktywowane są w ścieżkach sygnalizacyjnych TGF- $\beta$ /aktywiny, a ich odpowiednikiem u *D. melanogaster* jest białko dSmad2 [9]. Smad4 jest jedynym znanym białkiem współpośredniczącym, a jego funkcję u *D. melanogaster* spełnia białko Medea [78]. Smad4 tworzy kompleksy z R-Smad. Białka hamujące Smad6 specyficznie hamują ścieżki sygnalizacyjne BMP, a Smad7 ścieżki sygnalizacyjne TGF- $\beta$  [29]. U *D. melanogaster* białkiem hamującym jest Dad.

Wszystkie białka Smad wykazują podobną budowę (ryc. 3), przy czym białka R-Smad oraz Co-Smad zbudowane są z dwóch domen: MH1 (ang. *Mad Homology 1*) i MH2 (ang. *Mad Homology 2*) związanych łącznikiem (z ang. linker), podczas gdy I-Smad posiadają wyłącznie domenę MH2 oraz łącznik. N-końcowa domena MH1 zbudowana jest z ok. 130 reszt aminokwasowych. Jej zasadniczą funkcją jest wiązanie DNA poprzez motyw zwany „spinką do włosów z pętlą” (z ang.  $\beta$ -hairpin loop), zbudowany z 11 reszt aminokwasowych. Domena MH1 oddziałuje też z czynnikami transkrypcyjnymi oraz uczestniczy w translokacji kompleksów R-Smad-Co-Smad do



**RYCINA 3.** Struktura białek regulatorowych Smad (R-Smad), z zaznaczonymi w łączniku miejscami fosforylowanymi przez kinazy MAP i GSK-3, oraz Smad współpośredniczących (Co-Smad) i hamujących (I-Smad).

**FIGURE 3.** Components of R-Smad proteins with MAP and GSK-3 phosphorylation sites marked in the linker region as well as structures of co- and I-Smad proteins.

jądra komórkowego. Zawiera ona sekwencję lokalizacji jądrowej NLS (ang. *Nuclear Localization Signal*) bogatą w reszty lizyny, która jest konserwatywna dla wszystkich R-Smad. Sekwencja NLS odsłaniana jest dopiero w momencie fosforylacji C-końcowej domeny MH2, co umożliwia rozpoznawanie tej sekwencji przez importyny- $\beta$ , które się do niej wiążą [14, 44]. Importyny są receptorami dla sygnału lokalizacji jądrowej. Lokalizują się zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze.

MH2 jest C-kończącą domeną występującą w R-Smad i Co-Smad. Złożona jest z ok. 200 reszt aminokwasowych, a jej charakterystyczną cechą jest obecność motywu SSXS. Ten konserwatywny motyw jest fosforylowany przez receptory BMP typu I, co aktywuje sygnalizację poprzez R-Smad. Domena MH2 umożliwia m.in. zakotwiczenie Smad2 w błonie komórkowej poprzez oddziaływanie z białkami SARA (ang. *Smad Anchor for Receptor Activation*). Podobnie jak w przypadku domeny MH1, białka Smad oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi również z udziałem domeny MH2. W przypadku braku stymulacji ligandem, domeny MH1 i MH2 hamują nawzajem swoje funkcje poprzez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania [30]. Fosforylacja R-Smad w domenie C-końcowej zwalnia te wzajemne oddziaływania. Domena MH2 zawiera również motyw nazywany pętlą L3 (ang. *L3 loop*). Pętla L3 uczestniczy w wiązaniu Smad1 z receptorem BMP oraz Smad2 z receptorem TGF- $\beta$ . [40]. Sekwencja pętli L3 jest niezmienna w białkach Smad2/3 oraz Smad1/5/8, ale reszty Ser427 są kluczowe dla aktywacji białek Smad1/5/8, a reszty Ser430 dla aktywacji Smad2/3, odpowiednio przez BMP i TGF- $\beta$ . Pętla L3 jest również istotna dla kompleksowania R-Smads z Co-Smad. W przypadku aktywacji ścieżki kanonicznej przez BMP powszechnie uważa się, że uformowanie kompleksu Smad1/5/8-Smad4 umożliwia ich transport do jądra komórkowego. Okazuje się jednak, że tworzenie kompleksu Smad1/5/8 ze Smad4 i przemieszczanie się Smad1/5/8 mogą przebiegać niezależnie od siebie. Smad4 nie jest wymagany, aby nastąpiła translokacja jądrowa białek Smad1/5/8, ale R-Smad są konieczne, aby Smad4 znalazł się w jądrze [30]. Obecność Smad4 w jądrze warunkuje utworzenie kompleksu transkrypcyjnego regulującego procesy transkrypcji genów, takich jak *Osx*, *Runx2* i *Dlx5*, mających istotne znaczenie dla osteogenezy [32-34, 43, 50-51, 69].

Łącznik występujący w białkach R-Smad zawiera cztery kopie motywu Pro-X-Pro-Ser (PXPS). We wszystkich ludzkich białkach Smad w obrębie motywu PXPS fosforylacji ulegają reszty Ser187, Ser195, Ser206 i Ser214 w wyniku działania kinaz MAP tj. ERK, p38 i JNK. Region łącznika fosforylowany może być również przez kinazę GSK3 (ang. *Glycogen Synthase Kinase 3*) na resztach Ser191, Ser198, Thr202, Ser210 [19]. Dodatkowo, łącznik białek Smad cechuje obecność motywu Pro-Pro-X-Tyr (PPXY) zlokalizowanego w pobliżu reszt aminokwasowych fosforylowanych przez GSK3. Do tego motywu wiąże się ligaza ubikwitynowa Smurf1 (ang. *Smad ubiquitination regulatory factor 1*). Związanie Smurf1 do łącznika może odpowiadać wówczas za skierowanie białek Smad do proteosomalnej degradacji [36].

## ZNACZENIE FOSFORYLACJI ŁĄCZNIKA BIAŁEK SMAD W OSTEOGENEZIE

Jak wspomniano wcześniej, fosforylacja motywu PXPS w łączniku Smad1/5/8 przez MAPK może hamować translokację Smad1/5/8 do jądra komórkowego, a tym samym hamować aktywność transkrypcyjną Smad1/5/8 [30, 68]. Aktywatorami kinaz MAP mogą być m.in. epidermalny i fibroblastyczny czynnik wzrostu (EGF, FGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), wspomniany wcześniej transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- $\beta$ ) oraz czynniki stresowe jak np. promieniowanie UV [61].

Warto zaznaczyć, że homologiczne do ludzkich SMAD, białko Mad *Drosophila*, może być fosforylowane również w domenie MH1 przez kinazę Nlk (ang. *Nemo like kinase*), należącą do rodziny kinaz MAP. Wspomniana fosforylacja również zapobiega translokacji aktywowanych przez receptor białek Mad do jądra, co w konsekwencji hamuje aktywność transkrypcyjną białek Mad [83].

Nie do końca wiadomo, w jakich przedziałach komórkowych zachodzi fosforylacja łącznika. Eivers i wsp. [17] wskazują, że fosforylacja za pośrednictwem MAPK ma miejsce w jądrze komórkowym, podczas gdy Kretschmar i wsp. [30] twierdzą, że łącznik fosforylowany jest tak w jądrze jak i w cytoplazmie. Najnowsze doniesienia sugerują, że w proces fosforylacji regionu łącznika może być zaangażowane również BMP. Okazuje się jednak, że fosforylacja łącznika przez BMP niekoniecznie zachodzi w wyniku aktywowania przez BMP kinaz ERK, p38 czy JNK [31, 68]. Alarco'n i wsp. [3] wskazują, że BMP może fosforylować łącznik Smad1/5/8 za pośrednictwem cyklino-zależnych kinaz CDK8 i CDK9. Fosforylacji ulegają wówczas najczęściej reszty Ser206 i Ser214, a rzadziej Ser187 i Ser195. To odróżnia cyklino-zależną fosforylację linkera od ERK-zależnej, gdzie fosforylacji ulegać powinny wszystkie cztery reszty serynowe z jednakową efektywnością. BMP-zależna (tj. cyklino-zależna) fosforylacja łącznika zachodzi wtórnie do fosforylacji motywu SSXS w regionie C-końca R-Smad. Tak ufosforylowane Smad akumulują się głównie w jądrze komórkowym. Autorzy sugerują jednak, że R-Smad fosforylowane w rejonie łącznika, w wyniku aktywacji alternatywnych ścieżek sygnalizacji BMP, posiadają niską aktywność transkrypcyjną. Ponadto, fosforylacja łącznika sprzyjać może wiązaniu Smurf1 do R-Smads i ich degradacji proteasomalnej [3]. Guicheux i wsp. [21] wykazali ponadto, że BMP efektywniej aktywuje p38 i JNK niż kinazę ERK. To wskazuje, że BMP może aktywować ścieżkę kanoniczną poprzez fosforylację Smad1/5/8, a równocześnie ją regulować poprzez aktywację ścieżek niekanonicznych i fosforylację łącznika Smad ścieżką cyklino- lub MAPK-zależną.

Obok reszt Ser, które mogą być fosforylowane przez MAPK i CDK8/9, region łącznika może być również fosforylowany przez GSK3, po uprzedniej fosforylacji łącznika przez kinazy MAP [19]. Działanie GSK3 jest hamowane np. przez kinazę

PI3K oraz Akt, insulinę/insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF) czy Wnt. Fuatetalba i wsp. [19] wykazali fosforylację linkera R-Smad przez GSK3 zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie. Ale, tak fosforylowane R-Smad gromadzą się głównie w cytoplazmie i związane do mikrotubul transportowane są do proteasomów [4]. Podsumowując, fosforylacja łącznika R-Smad przez GSK3 negatywnie reguluje ścieżkę kanoniczną aktywowaną przez BMP, a efektywność negatywnej regulacji przez GSK3 zależy od stopnia aktywności MAPK [8, 19]. Co istotne, zahamowanie działania GSK3 wydłuża w czasie aktywność R-Smad ufosforylowanych na C-końcu. W hamowanie aktywności kinazy GSK3 zaangażowana jest kanoniczna ścieżka sygnalizacyjna Wnt, tym samym wzmagając aktywność kanonicznej ścieżki sygnalizacyjnej BMP [17].

W proces degradacji R-Smad zaangażowane jest białko Smurf1. Smurf1 ma aktywność ligazy ubikwitynowej E3 i wiąże się do sekwencji PPXY łącznika Smad1, w pobliżu miejsca fosforylacji GSK3 [85]. Część doniesień literaturowych wskazuje, że oddziaływanie Smurf1 z Smad1 zależy od fosforylacji łącznika przez GSK3. Wówczas fosforylacja łącznika przez GSK3 powodowałaby zmianę konformacji Smad1 i odsłonięcie motywu PPXY dla Smurf1. To skutkowałoby dobudowaniem łańcucha poliubikwitynowego do Smad1 i skierowaniem go do degradacji proteasomalnej [19]. Inne badania sugerują, że wiązanie Smad1-Smurf1 odbywa się niezależnie od fosforylacji łącznika przez GSK3, a brak fosforylacji łącznika przez GSK3 może wzmacniać ubikwitynację i degradację Smad1. Wreszcie, C-końcowa fosforylacja Smad1 nie ma znaczenia dla przyłączania się białka Smurf1. Wiązanie Smurf1 do Smad1 nie zawsze jednak prowadzi do jego proteasomalnej degradacji, lecz może skutkować jego retencją w cytoplazmie. Wynika to m.in. z rywalizacji Smurf1 z Nup214 (ang. *Nuclear pore complex protein*), uczestniczącym w translokacji Smad do jądra komórkowego, dla którego wzór fosforylacji łącznika nie ma znaczenia [68, 81]. Białko Nup214 należy do nukleoporyn, wchodzących w skład porów jądrowych w komórkach eukariotycznych.

Ufosforylowane formy R-Smad mogą również podlegać defosforylacji za pośrednictwem fosfataz. W defosforylacji R-Smad w rejonie C-końca uczestniczą fosfatazy jądrowe z rodziny SCP (ang. *Small Polymerase II C-terminal Phosphatase*) i PPM1A (ang. *Protein Phosphatase Magnesium-dependent 1A*) [15]. Oba typy fosfataz defosforylują Smad1, a SCP może defosforylować też Smad2 oraz łącznik Smad1 i Smad2/3, co może skutkować wzmocnieniem sygnalizacji BMP i TGF- $\beta$ , odpowiednio [68].

W zależności od natury sygnału wywołującego fosforylację łącznika, los białek R-Smad może być różny. W 1997 roku Kretzschmar i wsp., [30] wykazali, że fosforylacja łącznika Smad1 przez ERK hamuje jądrową akumulację aktywnych form Smad, jednocześnie blokując sygnalizację BMP. W roku 2005 Osyczka i Leboy, [58] zasugerowały podobny mechanizm w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzenia szpikowego, gdzie zahamowanie kinazy

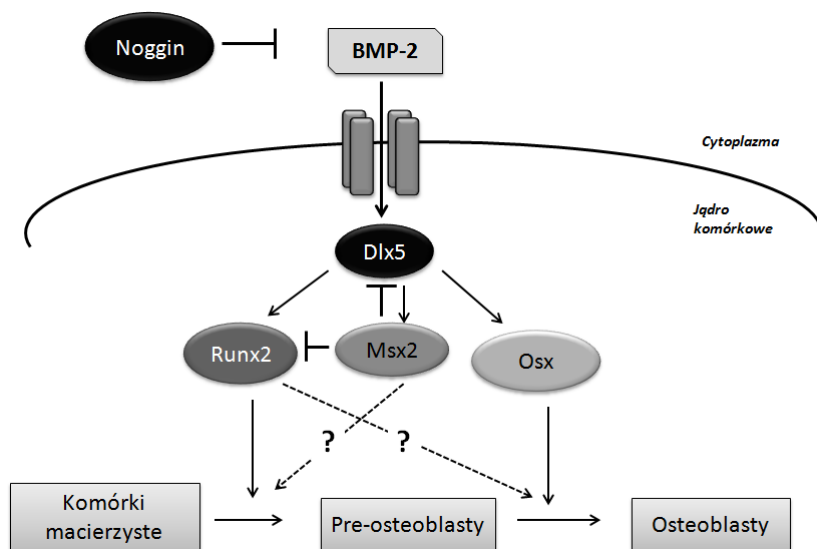
ERK znacząco zwiększało osteoinduktywne działanie BMP2 i skutkowało wyższym poziomem mRNA dla zasadowej fosfatazy (*Alp*), *Osp* oraz *Msx2*, wczesnych wskaźników osteogenezy. Ponadto, ekspresja konstytutywnie aktywnej kinazy MAPK/ERK1 obniżała w tych komórkach poziom jądrowych, aktywowanych przez BMP białek Smad1/5/8, co wskazywało na negatywną regulację osteogenezy przez ERK. Natomiast, nadekspresja w tych komórkach Smad1 pozbawionych reszt aminokwasowych fosforylowanych przez ERK skutkowała m.in. wyższą ekspresją mRNA dla siałoproteiny kości (*Bsp*), *Alp*, *BMP* oraz wyższym poziomem aktywnych form Smad1/5/8 w jądrze, w odpowiedzi na BMP2. [70].

Najnowsze doniesienia wskazują również pozytywne efekty fosforylacji łącznika Smad. Wykazano, że fosforylacja łącznika może pełnić funkcję stabilizującą aktywne Smad2/3, co w konsekwencji wydłuża czas ich aktywności transkrypcyjnej. W przypadku linii fibroblastów AKR-2B, białka Smad2/3 ufosforylowane na łączniku gromadzą się głównie w jądrze komórkowym i efektywnie regulują osteogenezę [24]. W związku z tym, fosforylację linkera powinno się traktować raczej jako mechanizm modulujący ścieżki sygnalizacji BMP w zależności od typu komórek i odbieranych przez nie bodźców.

## BIĄŁKA WCZESNEJ OSTEOGENEZY I ICH SMAD-ZALEŻNA EKSPRESJA

W wyniku kanonicznej sygnalizacji BMP, kompleksy R-Smad/co-Smad oddziałują z promotorami genów posiadających charakterystyczną sekwencję SRE (ang. *Smad-Response Elements*) i regulują transkrypcję. Wśród promotorów genów, których produkty są istotne dla inicjacji i postępu osteogenezy, sekwencję SRE posiadają: *Runx2* [38], *Osx* (osterix, znany również jako transcription factor Sp7) [42], *Dlx5* (ang. *Distal-less homeodomain protein 5*), *Msx2* (ang. *Mesh-less homeodomain protein 2*) [38] oraz antagonistą BMP – noggin [80] (ryc. 4).

RUNX2 jest nadrzędnym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym procesy kościotworzenia, a jego ekspresja jest kluczowa w osteoblastach i komórkach osteoprogenitorowych. Aktywność oraz stabilność RUNX2 jest regulowana za pośrednictwem wcześniej omawianych białek Smad [52]. W komórkach mysiej linii mioblastycznej C2C12, w których wyciszono ekspresję Smad1 i Smad5, obserwowano znaczące obniżenie ekspresji mRNA dla *Runx2* pomimo stymulacji BMP. Podobny efekt obserwowano w przypadku wyciszenia Smad4, gdyż uniemożliwiało to formowanie aktywnych kompleksów Smad4 ze Smad1 i Smad5. Chociaż RUNX2 jest wystarczający do inicjacji procesu osteogenezy, to utworzenie kompleksu RUNX2-Smad znacząco zwiększa efektywność różnicowania komórek C2C12 w osteoblasty [51]. Jednoczesne wywołanie nadekspresji białek Smad5 i RUNX2



**RYCINA 4.** Regulacja kluczowych osteogennych czynników transkrypcyjnych przez BMP  
**FIGURE 4.** BMP regulation of key osteogenic transcription factors

w tych komórkach skutkowało wyższą aktywnością ALP w porównaniu do komórek wykazujących nadekspresję tylko Smad5 lub RUNX2. Efekt był wzmacniany poprzez stymulację komórek BMP – komórki z nadekspresją obu białek okazały się 150 razy wrażliwsze na działanie BMP w porównaniu do komórek grupy kontrolnej [32].

Utworzenie kompleksu Smad-RUNX2 jest natomiast zależne od fosforylacji RUNX2 przez MAPK, a motyw SMID (ang. *Smad Interacting Domain*) występujący na C-końcu białka RUNX2 jest niezbędny do uformowania kompleksu [2]. Utworzenie kompleksu Smad-RUNX2 odsłania motyw NMTS (ang. *Nuclear Matrix Targeting Signal*) odpowiedzialny za translokację białek RUNX2 do jądra komórkowego. Aby zaburzyć tworzenie kompleksu Smad-RUNX2 konieczna jest mutacja trzech reszt: His-Thr-Tyr w obrębie motywu SMID. Utworzenie kompleksu regulacyjnego RUNX2-Smad wydaje się kluczowe dla procesu osteogenezy, ponieważ mutacje reszt His-Thr-Tyr w RUNX2 znacząco obniżają ekspresję genów takich jak *Osx*, *Kol I*, *Osc*, *Osp*, *Bsp*, a usunięcie z RUNX2 całego motywu SMID powoduje kompletny zanik ekspresji wyżej wspomnianych genów [27].

Aktywność RUNX2 prowadzi z kolei do stymulacji ekspresji Smad6, białka hamującego Smad1/5/8. Smad6 jest zaangażowane m.in. w procesy degradacji R-Smad zależne od Smurf1. Konkretnie, Smad6 tworzy kompleks ze Smurf1, a następnie kompleks ten przyłącza się do BMPRI, z jednej strony uniemożliwiając aktywowanie R-Smads, a z drugiej strony kierując BMPRI na drogę proteosomalnej degradacji. Ponadto, kompleksy Smad6-Smurf1 wiążą się do ufosforylowanych



R-Smads, również kierując je do degradacji zależnej od ubiquityny [49]. Obniżenie poziomu aktywnych R-Smads skutkuje obniżeniem aktywności RUNX2 [52].

Sygnalizacja BMP/Smad reguluje również ekspresję mRNA dla *Osx*, czynnika transkrypcyjnego ulegającego ekspresji podczas różnicowania komórek osteoprogenitorowych w funkcjonalne osteoblasty [36]. Nadekspresja Smad6 całkowicie uniemożliwiała indukcję *Alp* i *Osx* przez BMP w mysich komórkach linii C3H10T1/2 oraz C2C12. Natomiast, nadekspresja Smad1 i Smad4 zwiększała ekspresję *Osx* w w.w. komórkach pozbawionych *Runx2*. Dlatego, BMP-zależna regulacja *Osx* może odbywać się za pośrednictwem RUNX2 lub bez jego udziału. W procesie osteogenezy niektóre geny takie jak: *Wnt4*, *Bglap1* i *Bmp7* są aktywowane zarówno przez OSX jak i przez RUNX2 [46]. Natomiast *Osc* i *Bsp* aktywowane są wyłącznie przez OSX [34]. Według Mutsbara i wsp., [46] RUNX2 wydaje się jednak czynnikiem nadrzędnym w stosunku do OSX, ponieważ w komórkach mysich pozbawionych *Osx* obserwowano wzrost ekspresji *Runx2*, natomiast przy braku ekspresji *Runx2*, nie wykazano wzrostu poziomu mRNA dla *Osx*.

Stymulacja ekspresji *Osx* przez BMP zależy też od aktywności DLX5 [34]. DLX5 wiąże się do promotorów genów zawierających tzw. HRE (ang. *Homeodomain Response Elements*). Miejsca HRE zidentyfikowano w promotorach wielu genów charakterystycznych dla kościotworzenia jak: *Osc*, *Alp*, *Kol I*, *Bsp* oraz fibronektyna. Uważa się, że w wyniku działania BMP2 najpierw aktywowany jest *Dlx5*, który reguluje ekspresję *Runx2* oraz *Osx* i następnie kościotworzenie [65]. Wyciszenie DLX5 powoduje zahamowanie ekspresji *Osx* i *Runx2* [35-36]. To sugeruje nadrzędną rolę DLX5 względem RUNX2 w regulacji osteogenezy. Regulacja transkrypcji *Osx* przez DLX5 zależy natomiast od MSX2. W wyniku działania BMP2 poziom MSX-2 wyraźnie zwiększa się nawet w przypadku wyciszenia genu *Runx2*. Również nadekspresja *Msx2* prowadzi do stymulacji ekspresji OSX w mysich komórkach macierzystych pozbawionych *Runx2* [39, 46, 53].

Rola MSX2 w osteogenezie nie jest do końca jasna. Wiele doniesień wskazuje na antagonistyczną rolę DLX5 oraz MSX2 w stosunku do RUNX2. Jeden z modeli zakłada, że MSX2 wiąże RUNX2, przez co RUNX2 staje się transkrypcyjnie nieaktywny. Dopiero DLX5 uwalnia RUNX2 poprzez wiązanie się z MSX2. Przypuszcza się, że DLX5 i MSX2 mogą regulować siebie nawzajem [65]. Istnieją również wyniki wskazujące na pozytywną rolę MSX2 w procesie kościotworzenia. Mysie komórki linii mioblastycznej C2C12 oraz C3H10T1/2 wykazujące nadekspresję *Msx2* wykazywały znaczący wzrost aktywności ALP, a w pierwotnych mysich osteoblastach nadekspresja *Msx2* skutkowała zwiększoną depozycją wapnia. Ponadto, w zastosowanym modelu doświadczalnym, MSX2 w znikomym stopniu wpływał na proliferację komórek potwierdzając tym samym jego rolę w procesie różnicowania [26].

Wreszcie, bezpośrednim antagonistą BMP jest białko NOGGIN (NOG) [76]. NOGGIN wiąże zewnątrzkomórkowe BMP, uniemożliwiając dimeryzację BM-

PR-I i BMPR-II. Okazuje się, że ekspresja *Nog* rośnie znacząco w osteoblastach stymulowanych BMP2/4/6. NOG zatem może zapobiegać nadmiernej stymulacji komórek przez wiele różnych typów BMP uczestniczących w formowaniu tkanki kostnej. Obniżenie poziomu NOG w obecności BMP2 prowadzi m.in. do osteogenezy mysich komórek mioblastycznych [72]. Niemniej jednak, Chen i wsp. [11] donoszą, że obniżenie poziomu NOG w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych skutkuje niską ekspresją *Osc*, *Msx2* oraz *Runx2*, a także obniżoną aktywnością ALP i zmniejszoną akumulacją wapnia, co sugeruje że NOG może pełnić ważne funkcje w komórkach osteoprogenitorowych.

## PODSUMOWANIE

Dane literaturowe wskazują, że sygnalizacja BMP jest jednym z najwcześniejszych etapów osteogenezy i odgrywa istotną rolę w regulacji kluczowych osteogennych czynników transkrypcyjnych. Zarówno kanoniczne, Smad-zależne, jak i niekanoniczne ścieżki sygnalizacji BMP mogą wpływać na procesy inicjacji i postępu procesów kościotworzenia. Sposoby regulacji ścieżek sygnalizacji BMP w komórkach osteoprogenitorowych mogą w konsekwencji decydować o efektywności terapii tkanki kostnej. Dlatego badania mechanizmów aktywacji i regulacji ścieżek sygnalizacji BMP w komórkach tkanki kostnej i komórkach osteoprogenitorowych wydają się koniecznym i niezwykle istotnym elementem intensywnie rozwijających się obecnie terapii komórkowych, w tym: inżynierii tkankowej i genetycznej, mających na celu regenerację tkanki kostnej.

## PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2013-2015 w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Diamentowy Grant” nr 0030/DIA/2013/42

## LITERATURA

- [1] AARON WJ. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica* 2013; **2013**: 684736.
- [2] AFZAL F, PRATAP J, ITO K, ITO Y, STEIN JL, VAN WIJNEN AJ, STEIN GS, LIAN JB, JAVED A. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *J Cell Physiol* 2005; **204**: 63-72.

- [3] ALARCO'N C, ZAROMYTIDOU AI, XI Q, GAO S, YU J, FUJISAWA S, BARLAS A, MILLER AN, MANOVA-TODOROVA K, MACIAS MJ, SAPKOTA G, PAN D, MASSAGUE' J. Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- $\beta$  Pathways. *Cell* 2009; **13**: 757-769.
- [4] BADANO JL, TESLOVICH TM, KATSANIS N. The centrosome in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 194-205.
- [5] BHADRIRAJU K, YANG M, ALOM RUIZ S, PIRONE D, TAN J, CHEN CS. Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension. *Exp Cell Res* 2007; **313**: 3616-3623.
- [6] BISHOP AL, HALL A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000; **348**: 241-255.
- [7] BISHOP GB, EINHORN TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* (2007) **31**: 721-727.
- [8] BIVER E, SOUBRIER AS, THOUVEREY C, CORTET B, BROUX O, CAVERZASIO J, HARDOUIN P. Fibroblast growth factor 2 inhibits up-regulation of bone morphogenic proteins and their receptors during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **427**: 737-742.
- [9] BRUMMEL T, ABDOLLAH S, HAERRY TE, SHIMELL MJ, MERRIAM J, RAFTERY L, WRANA JL, O'CONNOR MB. The *Drosophila* activin receptor baboon signals through dSmad2 and controls cell proliferation but not patterning during larval development. *Genes Dev* 1999; **13**: 98-111.
- [10] CARREIRA AC, LOJUDICE FH, HALCSIK E, NAVARRO RD, SOGAYAR MC, GRANJEIRO JM. Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives. *J Dent Res* 2014; **93**: 335-345.
- [11] CHEN C, ULUDAĞ H, WANG Z, JIANG H. Noggin suppression decreases BMP2-induced osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 2012; **113**: 3672-3680.
- [12] CHEN YG, LIU F, MASSAGUÉ J. Mechanism of TGF receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 1997; **16**: 3866-3876.
- [13] CHRASTIL J, LOW JB, WHANG PG, PATEL AA. Complications Associated With the Use of the Recombinant Human Bone Morphogenetic Proteins for Posterior Interbody Fusions of the Lumbar Spine. *Spine* 2013; **38**: E1020-E102.
- [14] DERYNCK R, ZHANG YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling. *Nature* 2003; **9**: 577-584.
- [15] DUAN X, LIANG YY, FENG XH, LIN X. Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* 2006; **281**: 36526-36532.
- [16] EDLUND S, LANDSTRÖM M, HELDIN CH, ASPENSTRÖM P. Transforming growth factor- $\beta$ -induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 902-914.
- [17] EIVERS E, DEMAGNY H, DE ROBERTIS EM. Integration of BMP and Wnt Signaling via vertebrate Smad1/5/8 and *Drosophila* Mad. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; **20**: 357-365.
- [18] ENGEL ME, MCDONNELL MA, LAW BK, MOSES HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- $\beta$ -mediated transcription. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37413-37420.
- [19] FUENTEALBA LC, EIVERS E, IKEDA A, HURTADO C, KURODA H, PERA EM. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 2007; **131**: 980-993.
- [20] GOVONI KE. Insulin-like growth factor-I molecular pathways in osteoblasts: potential targets for pharmacological manipulation. *Curr Mol Pharmacol*. 2012; **5**: 143-152.
- [21] GUICHEUX J, LEMONNIER J, GHAYOR C, SUZUKI A, PALMER G, CAVERZASIO J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Minel Res* 2003; **18**: 2060-2068.
- [22] GUO X, WANG XF. Signaling cross-talk between TGF- $\beta$ /BMP and other pathways. *Cell Res* 2009; **19**: 71-88.
- [23] HERPIN A, CUNNINGHAM C. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters. *FEBS J* 2007; **274**: 2977-2985.

- [24] HOUGH C, RADU M, DORE JJE. TGF-Beta Induced Erk Phosphorylation of Smad Linker Region Regulates Smad Signaling. *PLoS ONE* 2012; **7**: e42513.
- [25] HUANG RL, YUAN Y, TU J, ZOU GM, LI Q. Opposing TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ - and BMP2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP2-induced osteoblastic differentiation. *Cell Death Dis.* 2014; **5**: e1187.
- [26] ICHIDA F, NISHIMURA R, HATA K, MATSUBARA T, IKEDA F, HISADA K, YATANI H, CAO X, KOMORI T, YAMAGUCHI A, YONEDA T. Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 34015-34022.
- [27] JAVED A, BAE JS, AFZAL F, GUTIERREZ S, PRATAP J, ZAIDI SK, LOU Y, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB. Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal. *J Biol Chem* 2008; **283**: 8412-8422.
- [28] KAMIYA N, YE L, KOBAYASHI T, LUCAS DJ, MOCHIDA Y, YAMAUCHI M, KRONENBERG HM, FENG JQ, MISHINA Y. Disruption of BMP signaling in osteoblasts through type IA receptor (BMPRIA) increases bone mass. *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 2007-2017.
- [29] KAWABATA M, IMAMURA T, INOUE H, HANAI J, NISHIHARA A, HANYU A, TAKASE M, ISHIDOU Y, UDAGAWA Y, OEDA E, GOTO D, YAGI K, KATO M, MIYAZONO K. Intracellular signaling of the TGF- $\beta$  superfamily by Smad proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **886**: 73-82.
- [30] KRETZSCHMAR M, LIU F, HATA A, DOODY J, MASSAGUÉ J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes dev* 1997; **11**: 984-995.
- [31] KURODA H, FUENTEALBA L, IKEDA A, REVERSADE B, DE ROBERTIS EM. Default neural induction: neutralization of dissociated Xenopus cells is mediated by Ras/MAPK activation. *Genes Dev* 2005; **19**: 1022-1027.
- [32] LEE KS, KIM HJ, LI QL, CHI XZ, UETA C, KOMORI T, WOZNEY JM, KIM EG, CHOI JY, RYOO HM, BAE SC. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 8783- 8792.
- [33] LEE MH, JAVED A, KIM HJ, SHIN HI, GUTIERREZ S, CHOI JY, ROSEN V, STEIN JL, VAN WIJNEN AJ, STEIN GS, LIAN JB, RYOO HM. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999; **73**: 114-125.
- [34] LEE MH, KIM YJ, KIM HJ, PARK HD, KANG AR, KYUNG HM, SUNG JH, WOZNEY JM, RYOO HM. BMP2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem* 2003; **278**: 34387-34394.
- [35] LEE MH, KIM YJ, YOON WJ, KIM JI, KIM BG, HWANG YS, WOZNEY JM, CHI XZ, BAE SC, CHOI KY. Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem* 2005; **280**: 35579-35587.
- [36] LEE MH, KWON TG, PARK HS, WOZNEY JM, RYOO HM. BMP2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003a; **309**: 689-694.
- [37] LI H, LIU D, ZHAO CQ, JIANG LS, DAI LY. Insulin potentiates the proliferation and bone morphogenetic protein-2-induced osteogenic differentiation of rat spinal ligament cells via extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Spine* 2008; **33**: 2394-2402.
- [38] LIAN JB, STEIN GS, JAVED A, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, MONTECINO M, HASSAN MQ, GAUR T, LENGNER CJ, YOUNG DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2006; **7**: 1-16.
- [39] LIU TM, LEE EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; **19**: 254-263.
- [40] LO RS, CHEN YG, SHI Y, PAVLETICH NP, MASSAGUÉ J. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J* 1998; **17**: 996-1005.

- [41] LUU HH, SONG WX, LUO X, MANNING D, LUO J, DENG ZL, SHARFF KA, MONTAG AG, HAYDON RC, HE TC. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007; **25**: 665-677.
- [42] MANDAL CC, DRISSI H, CHOUDHURY G, GHOSH-CHOUDHURY N. Integration of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt kinase, and Smad signaling pathway in BMP2-induced osterix expression. *Calcif Tissue Int* 2010; **87**: 533-540.
- [43] MASSAGUE J, WOTTON D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; **19**: 1745-1754.
- [44] MASSAGUÉ J, SEOANE J, WOTTON D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; **19**: 2783-2810.
- [45] MASSAGUÉ J. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 753-791.
- [46] MATSUBARA T, KIDA K, YAMAGUCHI A, HATA K, ICHIDA F, MEGURO H, ABURATANI H, NISHIMURA R, YONEDA T. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 29119-29125.
- [47] MATSUMOTO Y, OTSUKA F, HINO J, MIYOSHI T, TAKANO M, MIYAZATO M, MAKINO H, KANGAWA K. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by co-interacting Smad1/5/8 signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **350**: 78-86.
- [48] MIYAZONO K, KAMIYA Y, MORIKAWA M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010; **147**: 35-51.
- [49] MURAKAMI G, WATABE T, TAKAOKA K, MIYAZONO K, IMAMURA T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 2809-2817.
- [50] NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, ZHANG Z, DENG JM, BEHRINGER R, DE CROMBRUGGHE B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; **108**: 17-29.
- [51] NISHIMURA R, HATA K, IKEDA F, ICHIDA F, SHIMOYAMA A, MATSUBARA T, WADA M, AMANO K, YONEDA T. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. *J Bone Mineral Metab* 2008; **26**: 203-212.
- [52] NISHIMURA R, HATA K, HARRIS SE, IKEDA F, YONEDA T. Core-binding factor  $\alpha 1$  (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone* 2002; **31**: 303-312.
- [53] NISHIMURA R, HATA K, MATSUBARA T, WAKABAYASHI M, YONEDA T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Bioch (Tokyo)* 2012; **151**: 247-254.
- [54] NOHE A, HASSEL S, EHRLICH M, NEUBAUER F, SEBALD W, HENIS YI, KNAUS P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP2 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; **15**: 5330-5338.
- [55] ONISHI M, FUJITA Y, YOSHIKAWA H, YAMASHITA T. Inhibition of Rac1 promotes BMP2-induced osteoblastic differentiation. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e698.
- [56] OSYCZKA AM, DIEFENDERFER DL, BHARGAVA G, LEBY PS. Different effects of BMP2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organ* 2004; **176**: 109-119.
- [57] OSYCZKA AM, DAMEK-POPRAWA M, WOJTOWICZ A, AKINTOYE SO. Age and skeletal sites affect BMP2 responsiveness of human bone marrow stromal cells. *Connect Tissue Res* 2009; **50**: 2770-2777.
- [58] OSYCZKA AM, LEBY PS. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology* 2005; **146**: 3428-3437.
- [59] OTSUKA F. Multifunctional Bone Morphogenetic Protein System in Endocrinology. *Acta Med Okayama* 2013; **67**: 75-86.
- [60] PADGETT RW, CHO SH, EVANGELISTA C. Smads are the central component in transforming growth factor-beta signaling. *Pharmacol Ther* 1998; **78**: 47-52.
- [61] PERA EM, IKEDA A, EIVERS S, DE ROBERTIS EM. Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev* 2003; **17**: 3023-3028.

- [62] PIGNOLO RJ, SHORE EM, KAPLAN FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons. *Pediatr Endocrinol Rev* 2013; **2**: 437-448.
- [63] PROWSE PD, ELLIOTT CG, HUTTER J, HAMILTON DW. Inhibition of Rac and ROCK signalling influence osteoblast adhesion, differentiation and mineralization on titanium topographies. *PLoS One* 2013; **8**: e58898.
- [64] RODEO SA, BODEN SD, MURRAY MM, EINHORN TA. 2011 AOA Symposium: Tissue Engineering and Tissue Regeneration AOA Critical Issues. *J Bone Joint Surg Am* 2013; 95.
- [65] RYOO HM, LEE MH, KIM YJ. Critical molecular switches involved in BMP2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 2006; **366**: 51-57.
- [66] SAMPATH TK, RASHKA KE, DOCTOR JS, TUCKER RF, HOFFMAN RM. Drosophila TGF- $\beta$  superfamily proteins induce endochondrial bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6004-6008.
- [67] SANO Y, HARADA J, TASHIRO S, GOTOH-MANDEVILLE R, MAEKAWA T, ISHII S. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 8949-8957.
- [68] SAPKOTA G, ALARCO NC, SPAGNOLI FM, BRIVANLOU AH, MASSAGUE J. Balancing BMP Signaling through Integrated Inputs into the Smad1 Linker. *Mol Cell* 2007; **25**: 441-454.
- [69] SHI Y, MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685-700.
- [70] SKARŻYŃSKA J, DAMULEWICZ M, FILIPOWSKA J, MADEJ W, LEBOY PS, OSYCZKA AM. Modification of Smad1 linker modulates BMP-mediated osteogenesis of adult human MSC. *Connect Tissue Res* 2011; **52**: 408-414.
- [71] SOUCHELNITSKYI S, DIJKE P, MIYAZONO K, HELDIN CH. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *EMBO J* 1996; **15**: 6231-6240.
- [72] TAKAYAMA K, SUZUKI A, MANAKA T, TAGUCHI S, HASHIMOTO Y, IMAI Y, WAKITANI S, TAKAOKA K. RNA interference for noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro. *J Bone Mineral Metab* 2009; **27**: 402-411.
- [73] URIST MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; **150**: 893-899.
- [74] VALLEJO LF, RINAS U. Folding and dimerization kinetics of bone morphogenetic protein-2, a member of the transforming growth factor- $\beta$  family. *FEBS J* 2013; **28**: 83-92.
- [75] VINALS F, LOPEZ-ROVIRA T, ROSA JL, VENTURA F. Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP2. *FEBS Lett* 2002; **510**: 99-104.
- [76] WAN DC, POMERANTZ JH, BRUNET LJ, KIM JB, CHOU YF, WU BM, HARLAND R, BLAU HM, LONGAKER MT. Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *J Biol Chem* 2007; **282**: 26450-26459.
- [77] WANG YK, YU X, COHEN DM, WOZNIAK MA, YANG MT, GAO L, EYCKMANS J, CHEN CS. Bone morphogenetic protein-2-induced signaling and osteogenesis is regulated by cell shape, RhoA/ROCK, and cytoskeletal tension. *Stem Cells Dev* 2012; **21**: 1176-1186.
- [78] WHITMAN M. Smads and early developmental signaling by the TGF superfamily. *Genes Dev* 1998; **12**: 2445-2462.
- [79] WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK LM, WHITTERS MJ, KRIZ RW, HEWICK RM, WANG EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; **242**: 1528-1534.
- [80] WU XB, LI Y, SCHNEIDER AW, RAJENDREN G, IQBAL J, YAMAMOTO M, ALAM M, BRUNET LJ, BLAIR HC, ZAIDI M, ABE E. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J Clin Invest* 2003; **112**: 924-934.
- [81] XU L, ALARCON C, COL S, MASSAGUE J. Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J Biol Chem* 2003; **278**: 42569-42577.
- [82] YOSHIKAWA H, YOSHIOKA K, NAKASE T, ITOH K. Stimulation of ectopic bone formation in response to BMP2 by Rho kinase inhibitor: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 2009; **467**: 3087-3095.



- [83] ZENG YA, RAHNAMA M, WANG S, SOSU-SEDZORME W, VERHEYEN EM. Drosophila Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation. Dev 2007; **134**: 2061-2071.
- [84] ZHANG Y, FENG X-H, WU R-Y, DERYNCK R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. Nature 1996; **383**: 168-172.
- [85] ZHU H, KAVSAK P, ABDOLLAH S, WRANA JL, THOMSEN GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. Nature 1999; **400**: 687-693.

*Redaktor prowadzący – Michał Nowicki*

*Otrzymano: 21.03.2015*

*Przyjęto: 25.06.2015*

*Anna M. Osyczka*

*Zakład Biologii i Obrazowania Komórki Instytut Zoologii*

*Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński*

*ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków,*

*tel. +48 12 664 53 43*

*e-mail: a.m.osyczka@uj.edu.pl*

